

マミズイトミミズの磷脂質区分に
おける磷代謝について (I)
磷脂質区分の調製

Phosphorus Metabolism in Phospholipid Fraction
of *Rhizodrilus limasus* (I)
Preparation and Purification of Phospholipid Fraction

大 山 重 信
Shigenobu Ooyama

It was shown previously ^{1) - 3)} the absorption of ^{32}P and the incorporation of absorbed ^{32}P into various acid-soluble nucleotides when a sludge worm, *Rhizodrilus limasus*, was exposed to ^{32}P containing water.

The present study deals with the preparation of phospholipid fraction from ^{32}P labeled *Rhizodrilus limasus* and the purification of the fraction by cellulose column chromatography.

The effectivenesses of extraction for lipid ester and ^{32}P activity from ^{32}P labeled *Rhizodrilus limasus* with $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (1 : 2) or (1 : 1) solvent were compared each other and no significant differences were observed between the effectivenesses of the two (Table 2). Phospholipid fraction obtained according to Table 1 was passed through cellulose column (Fig. 2) and the atomic N/P ratio of the fraction reduced from 1.07 to 0.85. 26 % of lipid ester (E_{510}) and 82 % of ^{32}P activity which existed in $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (1 : 1) extract were found in phospholipid fraction, respectively (Table 3).

I 緒 言

マミズイトミミズ, *Rhizodrilus limasus*, によって水中から吸収された ^{32}P が, 最初酸可溶磷化合物に入り漸次核酸および磷脂質に移行蓄積されることは, 既に明らかにされている¹⁾。また, 先に筆者は小林らと共に, マミズイトミミズの酸可溶区分における ^{32}P の代謝について研究し, 酸可溶区分中の種々の磷化合物に ^{32}P がとりこまれている模様を明らかにする²⁾と共に, 再クロマトグラフィをも行ない, 酸可溶区分中における ^{32}P の化合物形態に

ついて明らかにした³⁾が、今回筆者は酸可溶区分に続いてマミズイトミミズの磷脂質区分をとり上げ、酸可溶区分の場合と同様に ^{32}P ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$) を用い磷脂質区分における磷の代謝の様相を明らかにすることとした。水棲動物の磷脂質に関しては、魚類^{4) -11)}・貝類^{12) -14)}等について多くの研究があるが、いずれも磷脂質類の含量についての報告である。

II 実験方法

1 試料

先報¹⁾⁻³⁾と同様にマミズイトミミズを用いた。採集したマミズイトミミズは、えさを与えずに3日間流水中に飼育し汚物を排泄させると共に、一匹ずつ肉眼的に選別し傷を有するものはすべて除外した。

2 溶媒の精製

使用した溶媒はそれぞれ次のようにして精製^{15, 16)}し窒素ガスを十分に吹き込んだ後使用した。メタノール：生石灰を加え蒸留した。エタノール：水酸化ナトリウムと亜鉛末とを加え30分以上還流煮沸した後蒸留した。クロロホルム：水と共に充分振とう後水層を捨てて蒸留し、メタノールを1%添加した。アセトン：固形過マンガン酸カリを加え還流煮沸した後、炭酸カリを加えて蒸留した。エーテル：そのまま蒸留した。

3 磷脂質区分の抽出

Table 1に示すように行なった。すなわち、 ^{32}P を含む水中に培養したイトミミズを、 ^{32}P を含まない水で3回洗浄してからイトミミズに付着する水分を濾紙で除き1.5 gを秤量してメタノール：クロホルム(1:1)(以下メタノールはM、クロホルムはCと略記する)溶媒15 ml中に投入し、直ちに2分間ホモゲナイズして3,000 rpmで5分間遠心した。この上澄液をとり窒素ガス気流中で減圧下に乾固(外水温30~35°C)してからエーテル5 mlによる抽出を5回くり返し、エーテル抽出液を集めて遠心し、上澄液のみをとり、窒素ガス気流下に1 mlまたはそれ以下に減圧濃縮したのちアセトン10 mlを加え-15°Cに一夜放置後アセトンで3回洗浄遠心して得られたものを磷脂質区分とした。

4 Lipid ester の定量

Snyderらの方法¹⁷⁾により定量した。すなわち、脂質溶液2 mlを試験管にとり、赤外線ランプにより溶媒を除去してからアセトン0.5 mlを加え、このアセトンも除去する。次にアルカリ性ヒドロキシルアミンアルコール溶液1 mlを加え、65°Cで2分間加熱した後5分間冷却し酸性過塩素酸鉄溶液2.5 mlを加え30分後に510 mμで比色した。

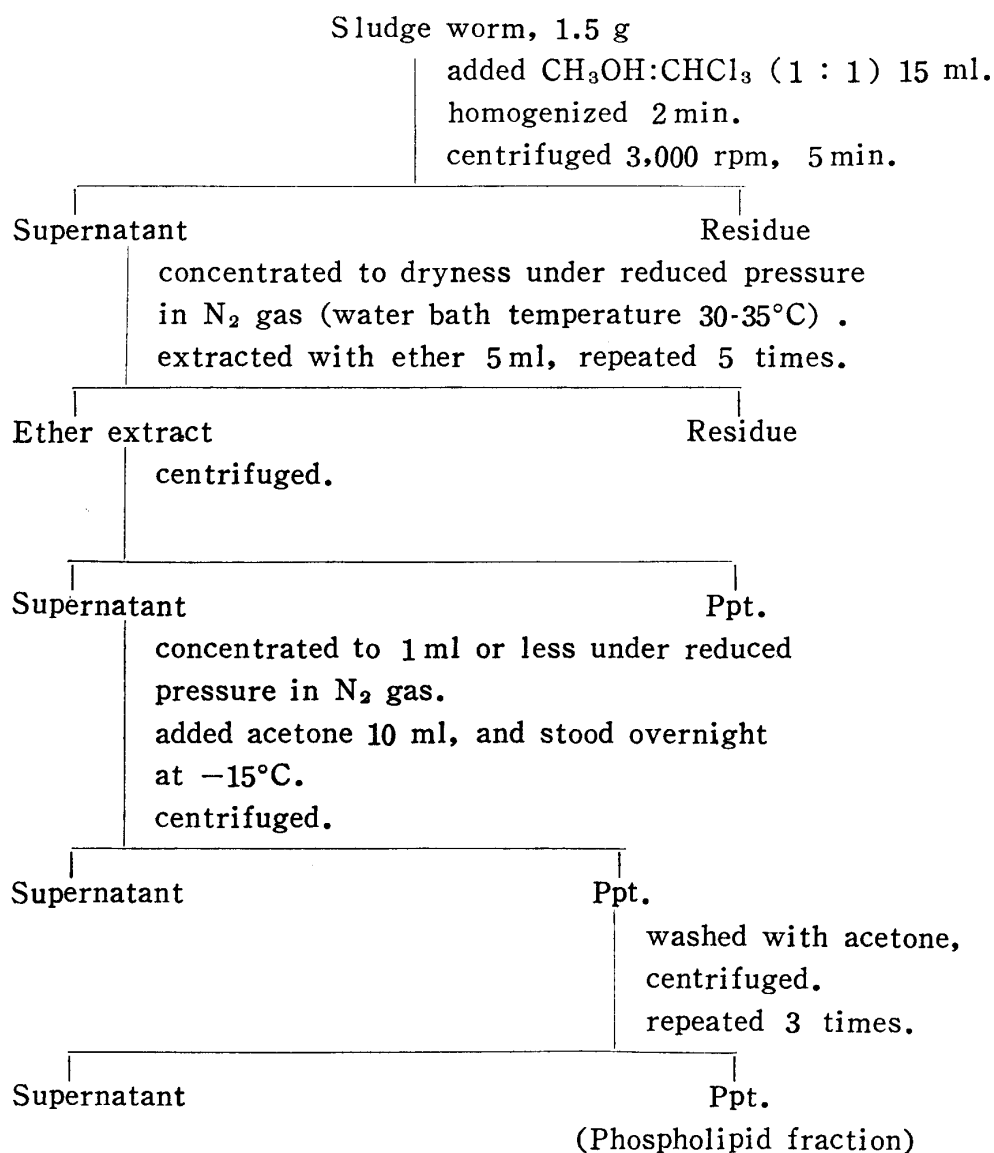
5 磷の定量

Fiske-Subbarowの方法¹⁸⁾を改変したBartlettの方法¹⁹⁾によった。

6 窒素の定量

Conwayの微量拡散法²⁰⁾によった。

Table 1. Scheme for preparation of phospholipid fraction from a sludge worm, *Rhizodrilus limasus*.



7 セルロースカラムクロマトグラフィ

東洋汙紙製セルロースパウダー, 100 mesh をまずメタノールでよく洗浄後さらに水で洗浄し微粒子の粉末を除き乾燥させる。これをクロロホルムに懸濁し気泡が生じないようにコック付カラムに充填 (カラム直径は1.4 cm, 高さ22 cmに充填) した後カラム容積の3倍量のM:C (1:1) 溶媒を流した後, 少量のM:C (1:1) 溶媒に溶解した試料を吸着

させ、その後直ちにM : C (1 : 1) 溶媒300 mlを1分間1 mlの流速で流して溶出した。

8 放射能の測定

溶液の放射能は東芝製 EAG 31103型 Radiation Counter のスケラーに日本無線製液浸用GM管1206を接続して測定した。

III 結果および考察

1 磷脂質の抽出

磷脂質の抽出溶媒としては一般にM : C (1 : 2) 溶媒を用いる Folch 法^{2D}がよく適用されているが、イトミミズにこの溶媒を用いてみたところ、溶媒の比重が高いため8,000 rpmで10分間遠心しても上澄液と残渣とに分離できなかった。また³²Pを吸収させたイトミミズ1.5 gに(1 : 1)または(1 : 2)溶媒15 mlを加えホモゲナイズし、東洋汙紙No. 6により汙過して汙過液を得る操作を3回くり返し、得られた各汙過液について lipid ester と³²P放射能とを測定し両溶媒の抽出率を比較した結果は Table 2に示すようであった。表にみられるように3回の抽出により lipid ester として定量されるものおよび³²P放射能の全てが抽出され第1回目の抽出によって lipid ester および³²P放射能の97 %程度あるいはそれ以上が抽出されており、(1 : 2)溶媒と(1 : 1)溶媒による抽出率の差はほとんどみられなかったので遠心分離により容易に上澄液を残渣とを分離できる(1 : 1)溶媒を用い

Table 2. Amounts of lipid ester (E₅₁₀) and ³²P activity found in CH₃OH : CHCl₃ extracts obtained from ³²P-labeled *Rhizodrilus limasus* with CH₃OH : CHCl₃ (1 : 2) or (1 : 1) .

Extraction with CH ₃ OH : CHCl ₃ mixed solvent	CH ₃ OH : CHCl ₃ (1 : 2)				CH ₃ OH : CHCl ₃ (1 : 1)			
	Lipid ester		³² P activity		Lipid ester		³² P activity	
	E ₅₁₀	%	cpm	%	E ₅₁₀	%	cpm	%
1 st.	4.734	97.6	4,950	100.0	4.496	96.8	5,160	97.8
2 nd.	0.101	2.1	0	0	0.131	2.8	70	1.3
3 rd.	0.015	0.3	0	0	0.018	0.4	46	0.9
Total	4.850	100.0	4,950	100.0	4.645	100.0	5,276	100.0

Rhizodrilus limasus was cultured in ³²P-containing water for 24 hrs. under constant aeration. Temperature of culture water : 21.5–23.0°C.

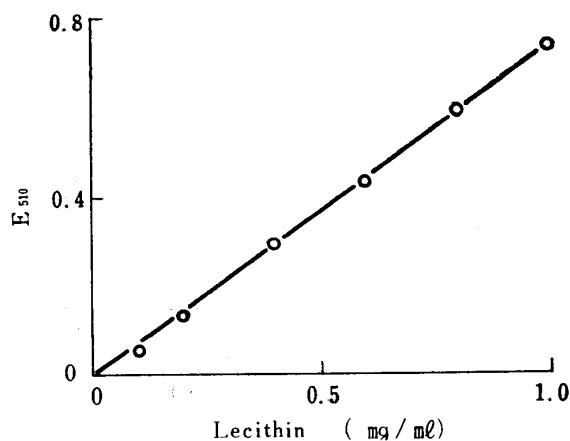
Volume of water:1.8 l. ³²P activity of water : 207,500 cpm.

マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝について (I)

ることをした。M : C (1 : 1) 溶媒により抽出した後の操作は磷脂質の エーテルとアセトンに対する溶解性を利用し Table 1 に示すように行なった。

なお、レシチン (Nutritional Biochemicals Corp. 製, 動物製, 純度90 %) をM : C (1 : 1) 溶媒に溶解し, Snyder らの方法¹⁷⁾ によって発色させた場合の標準曲線を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 Standard curve for lecithin.

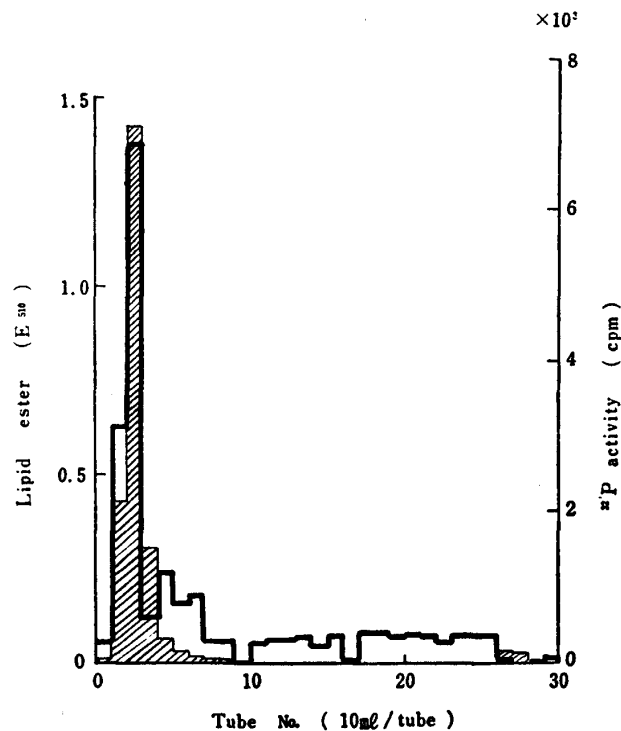


Lecithin (Nutritional Biochemicals Corp., animal, purity 90 %) was resolved in $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3$ (1 : 1) solvent and measured using the method of Snyder et al¹⁷⁾.

2 セルロースカラムクロマトグラフィ

Lea ら²²⁾ によれば, 磷脂質中に混在する他の窒素化合物はセルロースカラムを通過させることにより除くことができる。よって, ^{32}P を含む培養水 2 l 中に24時間培養したイトミミズから Table 1 に従って得た磷脂質区分をM : C (1 : 1) 溶媒15 mlに溶解し, そのうち12 ml [M : C (1 : 1) 抽出液40 ml相当量すなわちイトミミズ生鮮4 g相当量] についてセルロースカラムクロマトを行ない, 溶出液を10 mlずつ分取し溶出液について lipid ester の定量法により吸光値 E_{510} を測定すると共に ^{32}P 放射能を測定した結果は Fig. 2 に示すよ

Fig. 2. Cellulose column chromatogram for phospholipid fraction obtained from ^{32}P -labeled *Rhizodrilus limasus*.



Bold line shows optical density at 510 $\text{m}\mu$ (lipid ester) and fine line with oblique line indicates radioactivity. Phospholipid fraction was resolved in $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (1 : 1) solvent, then adsorbed on cellulose column. Sample solution subjected to the chromatography was equivalent to 40 ml of $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (1 : 1) extract, that is, 4g of fresh ^{32}P -labeled sludge worm. Cellulose powder: "Toyo roshi" 100 mesh. Column size: dia. 1.4 cm, height 22 cm. Eluting agent: $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (1 : 1) 300 ml. Flow rate: 1 ml/min. Culture condition of sludge worm: see the footnote of Table 3.

うになった。図にみられるように溶出液100 ml程度でカラムより溶出されるlipid esterのほとんどが溶出され、lipid esterのピークと放射能のピークとはまったく一致した。Table 3はM:C (1 : 1) 溶媒による抽出からセルロースカラムクロマトに至る lipid ester

Table 3. E_{510} values and ^{32}P activity of $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3$ (1 : 1) extract, phospholipid fraction and eluate from cellulose column.

Fraction	Lipid ester		^{32}P activity	
	E_{510}	%	cpm	%
$\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3$ (1 : 1) extract	15.900	100.0	19,270	100.0
Phospholipid fraction	4.180	26.3	15,800	82.0
Eluate from cellulose column	3.990		12,130	

R. limasus was cultured in ^{32}P -containing water for 24 hrs. under constant aeration.

Temperature of water : 22.5-25.0°C. Volume of water : 2 ℓ . ^{32}P activity of water : 54,000 cpm.

(E_{510}) と放射能との測定結果をまとめて示したものである。表に示したように E_{510} からみれば M : C (1 : 1) 抽出液のうち 26 % が磷脂質区分として得られ、この磷脂質区分の E_{510} 値を 100 とした場合磷脂質区分のセルロースカラムクロマトにおける回収率は 95 % であった。放射能よりみると M : C (1 : 1) 抽出液の放射能のうち 82 % が磷脂質区分に見出され、この磷脂質区分の放射能を 100 とした場合セルロースカラムクロマトにおける回収率は 77 % であった。また、セルロースカラム通過前と通過後のものについて磷量と窒素量とを測定し atomic N/P ratio を求めたところ、その値はセルロースカラム通過前に 1.07 であったが通過後は 0.85 となり、セルロースカラムを通すことにより明らかにその値は低下した。

IV 要 約

マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝の模様を研究するため、まず磷脂質区分の抽出とその精製とについて検討した。

メタノール : クロロホルム (1 : 2) 溶媒を用いてもまた (1 : 1) 溶媒を用いてもほとんど同程度の lipid ester および放射能が抽出されたので実験操作の容易な (1 : 1) 溶媒を用いることとした。

磷脂質区分に含まれる不純物を除くためにセルロースカラムクロマトグラフィを行なった

ところ atomic N/P ratio は1.07から0.85に減少した。

メタノール：クロロホルム（1：1）溶媒により抽出された lipid ester のうち26 %が
磷脂質区分として得られ、また放射能のうち82 %が磷脂質区分中に見出された。

文 献

- 1) 小林邦男, 富山哲夫: 日水誌., 25, 576 (1959)
- 2) 小林邦男, 大山重信, 富山哲夫: 日水誌., 26, 338 (1960)
- 3) 大山重信, 小林邦男, 富山哲夫: 日本水産学会発表 (1961)
- 4) 山添義隆: 長崎造船短大研., 2, 28 (1962)
- 5) R. E. E. Jonas, and N. Tomlinson: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 19, 733 (1962)
- 6) C. Y. Shuster, J.R. Froines, and H.S. Olcott: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 41, 36 (1964)
- 7) M. H. Silk, and A.J. Dekoning: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 41, 619 (1964)
- 8) J. R. Froines, C.Y. Shuster and H.S. Olcott: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 877 (1965)
- 9) A. D. Dekoning: *J. Sci. Fd. Agric.*, 17, 112 (1966)
- 10) W. T. Roubal: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 44, 325 (1967)
- 11) 高間浩蔵, 座間宏一, 五十嵐久尚: 日水誌., 35, 1184 (1969)
- 12) 座間宏一, 羽田野六男, 五十嵐久尚: 日水誌., 26, 917 (1960)
- 13) 堀 太郎, 板坂 修: 生化学, 33, 169 (1961)
- 14) 五十嵐久尚, 座間宏一, 高間浩蔵: 北大水産彙., 12, 196 (1961)
- 15) 緒方 章: 化学実験操作法 上巻, 南江堂, 41 (1961)
- 16) 田中 稔: 実験化学便覧, 共立出版, 526 (1957)
- 17) F. Snyder, and N. Stephens: *Biochem. Biophys. Acta*, 34, 244 (1959)
- 18) C. H. Fisk, and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925)
- 19) G. R. Bartlett: *J. Biol. Chem.*, 234, 466 (1959)
- 20) E. J. Conway: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, Crosby Lockwood and son, Ltd., London, 75 (1939)
- 21) J. Folch, M. Lees, and G.H. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.*, 226, 497 (1957)
- 22) C. H. Lea, and D.N. Rhodes: *Biochem. J.*, 54, 467 (1953)

以上。